

异种器官移植中的 Gal α (1,3)Gal 抗原表位的研究进展

邢力 郭礼和

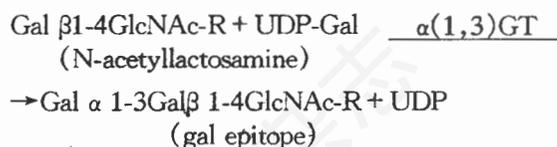
(中国科学院生物化学与细胞生物学研究所 上海 200031)

器官移植的成功造成器官供需之间的严重失衡,这种形式迫使科学和医学专家们去探索应用动物器官作为供体器官的可行性。目前普遍认为,把猪的器官移植给人的异种器官移植是解决供体器官缺乏的一种可能方案。然而,带有血管的猪的器官移植给灵长类动物后会首先被补体介导的免疫排斥反应迅速地排斥掉,这一过程叫做超急性排斥反应(Hyperacute rejection, HAR)^[1]。HAR 的主要病理变化为血栓形成,出血和水肿,在器官移植后的几分钟到几小时内迅速发生,造成移植器官的不可逆性功能丧失。它的发生是由于人体内的异种反应性天然抗性(Xenoreactive natural antibodies, XNAs)与猪器官血管内皮细胞表面的糖基结构结合从而引发补体系统的链式激活所致。

被 XNAs 识别的糖基表位主要是 Gal α (1,3)Gal(gal epitope)^[2],它是由 α (1,3)半乳糖转移酶 [Gal β 1, 4GlcNAc3- α -D-galactosyltransferase, α (1,3)GT; EC 2.4.1.51] 在高尔基体合成的,普遍存在于猪、小鼠及新世纪猴(New World monkeys)体内,人、猿及旧世纪猴(Old World monkeys)体内由于 α (1,3)GT 基因的功能丧失而不表达这种抗原结构。本文就对近 10 年来 Gal α (1,3)Gal 抗原表位的研究作一综述。

一、Gal α (1,3)Gal 的合成

Gal α (1,3)Gal 存在于很多不同分子的 N-连接, O-连接多糖及糖脂的糖链非还原末端,是在 α (1,3)GT 的催化下把半乳糖基以 α 1-3 键连接到 N-乙酰基乳糖胺的末端而形成。反应如下:



二、 α (1,3)GT cDNA 的克隆及基因结构

1. cDNA 克隆

小鼠^[3,4]、牛^[5]、猪^[6,7]及新世纪猴^[8]的 α (1,3)GT cDNA 均已被克隆,它们的开放阅读框架编码的蛋白质具有相同的结构域。 α (1,3)GT 为一典型 II 型整合膜蛋白,包含一短的胞质尾区(6 个氨基酸),一个跨膜区(16 个氨基酸),一个主干区和一个羧基末端催化域。猪、小鼠、牛及绒猴的 α (1,3)GT 在氨基酸序列上同源性最高的区域就在羧基末端,也就是具有酶催化活性的部位,同源性高达 78%^[8]。

与 α (1,3)GT 相关的一种半乳糖基转移酶是形成人的 B 血型的糖基转移酶,它也催化以 α 1-3 键连接的末端半乳糖基的增加,但与前者不同的是它只能以岩藻糖基化的 N-乙酰基乳糖胺作为半乳糖基的接受体。

2. 基因结构

基因结构研究得最清楚的是小鼠^[4]的 α (1,3)GT 基因,它位于 2 号染色体,总长 36kb,含有 9 个外显子,前 3 个外显子编码 mRNA 的 5'端非翻译序列,后面的 6 个外显子编码整个蛋白,其中酶的催化活性区域由最后一个外显子编码,它因此也是基因敲除(gene knockout)的理想靶区。猪和小鼠之间, α (1,3)GT 基因

的外显子在长度上很保守,只是猪的内含子普遍比小鼠的长^[9]。

小鼠 $\alpha(1,3)GT$ 至少有 4 种选择性剪接的同体型(见图)^[4],比较已经发表的序列^[6,7,9],猪体内这样的选择性剪接同体型也不会少于 3-4 种,而且这种选择性剪接与 $\alpha(1,3)GT$ 的酶活性息息相关。

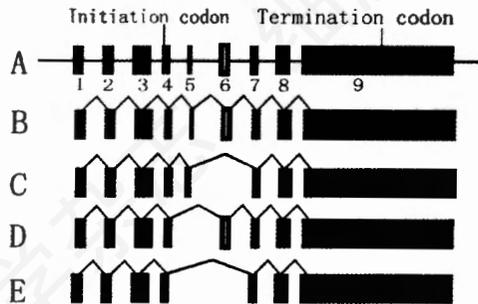


图 小鼠 $\alpha(1,3)GT$ 基因的结构及选择性剪接方式^[4]
A 为基因组结构,包含 9 个外显子;
B,C,D 和 E 为剪接后的 4 种不同 mRNA。

与小鼠 $\alpha(1,3)GT$ 基因同源的人的基因同序列被鉴定为 2 个非连锁假基因,一个位于 9 号染色体 q33-34 部位,另一个在 12 号染色体的 q14-15 部位^[10]。有趣的是 9 号染色体上的假基因与形成人的 AB 血型的糖基转移酶基因连锁,提示这几种糖基转移酶在进化上的相关性。

表 人和猪血管内皮细胞上的主要糖基表位结构^[13]

人	猪
Gal β 1-4GlcNAc β 1-R ^b	Gal β 1-4GlcNAc β 1-R ^b
ABH-Gal β 1-4GlcNAc β 1-R ^c	Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-R ^d
NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-R ^e	NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-R ^e

^aR 代表细胞膜上的糖脂或糖蛋白。

^bN-乙酰乳糖氨。

^cA, B, H, 或 AB 血型抗原。

^dGal α (1,3)Gal 抗原表位。

^eN-乙酰神经氨酸。

三、Gal α (1,3)Gal 的表达

在这个问题上人们最关心的是猪体内特别

是猪的血管内皮细胞上 Gal α (1,3)Gal 表位的表达。人和猪之间在糖基表位方面的主要差别就是人表达 ABH 血型抗原,而在这一位置上猪表达 Gal α (1,3)Gal 抗原^[11,12](见表)。

猪体内的所有血管内皮细胞,包括毛细血管,小动脉和小静脉都表达 Gal α (1,3)Gal^[11],其中在心脏血管内皮细胞上,尤以毛细血管内皮细胞的表达最强^[14],这里也是异种器官移植中人体 XNAs 与 Gal α (1,3)Gal 抗原表位相互作用的最重要部位。此外,在一些组织的实质特别是肝和肾也表达大量的 Gal α (1,3)Gal^[11]。肾脏中的表达呈差异性分布,近曲小管表达最强,其他部分较弱;肝脏的实质与管道表达基本一致;心肌细胞不表达;肺脏的肺泡内壁和支气管血管一样表达很强。成年猪的胰腺组织除血管和其它管道表达外,内分泌和外分泌组织不表达。

猪和小鼠之间在 Gal α (1,3)Gal 表达上有显著的差异。总体来讲,小鼠组织细胞上的表达较猪弱。应用特异结合 Gal α (1,3)Gal 抗原表位的 FITC (Fluorescein isothiocyanate) 标记 BS-IB₄ 凝集素 (*Bandeiraea simplicifolia* I isolectin B₄) 检测猪和小鼠的组织,结果小鼠的肾脏和肝脏与 BS-IB₄ 没有反应,而猪的这两种器官反应很强。但是 RT-PCR 的检测结果表明,小鼠的大多数组织都有 $\alpha(1,3)GT$ mRNA 的产生^[4]。

寻找不表达 Gal α (1,3)Gal 的猪也是非常有价值的工作,但不幸的是目前所有被检测的世界各地的包括欧洲,亚洲,美洲和澳洲的猪在血管内皮细胞上都存在 Gal α (1,3)Gal^[12]。没有这一表位的只有鸟类和爬行动物^[15],但由于免疫学和非免疫学上的原因不作用作人的供体。

四、抗 Gal α (1,3)Gal 抗体

人体 XNAs 中最主要的成分是能特异识别结合 Gal α (1,3)Gal 的抗体,即抗 gal 抗体。它是一种多克隆抗体,约占人血清中 IgG 总量的

1%, 包含 IgG 4 个亚型, 也有 IgM 和 IgA。由于人和其它的旧世纪灵长类动物没有 Gal α (1, 3)Gal 表位, 对这个抗原也不是免疫耐受的, 因此在胃肠道微生物抗原的刺激下终产生能与 Gal α (1, 3)Gal 特异结合的抗 gal 抗体, 负责这些抗体的产生者是多达 1% 的循环 B 细胞^[16]。在具有 Gal α (1, 3)Gal 表位的动物组织和细胞刺激下, 这些抗体的产生还会剧烈增加^[17-19]。

五、延缓型异种移植排斥反应

抗 gal 抗体与 Gal α (1, 3)Gal 之间的相互作用不仅通过激活补体系统引起 HAR 的发生, 对克服掉 HAR 之后紧接而来的非补体依赖性的延缓型异种移植排斥反应^[20] (Delayed xenograft rejection, DXR) 的发生也起重要作用, 这主要是通过抗体依赖的细胞介导细胞毒作用 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC), 异种植物细胞表面受体的激活和/或增强异种特异抗原的免疫原性^[18] 及内皮细胞激活^[21, 22] 等几种机制。NK 细胞直接结合到猪内皮细胞上的 Gal α (1, 3)Gal 表位上^[23], 人 α (1, 2)岩藻糖基转移酶在猪血管内皮细胞中表达后, 在降低细胞表面的 Gal α (1, 3)Gal 抗原表位的同时, 也降低了细胞本身对人 NK 细胞裂解作用的敏感性^[24], 这表明降低或抑制 Gal α (1, 3)Gal 的表达或阻碍 NK 细胞对 Gal α (1, 3)Gal 的识别会有助于克服 DXR。另外, 预先存在或诱导产生的抗 gal 抗体也可通过与 NK 细胞上 Fc 受体的结合而增强这种细胞性反应。

六、抑制细胞表面 Gal α (1, 3)Gal 表达的不同途径

抑制或降低猪血管内皮细胞上 Gal α (1, 3)Gal 的表达是克服异种移植排斥反应发生的重要一环, 目前实现这一目的的方法主要有以下几种。

1. 基因敲除

生产不表达 Gal α (1, 3)Gal 表位的猪显然

对克服异种移植排斥反应是非常有利的。可是, 基因敲除这一技术由于猪胚胎干细胞的原因还不能在猪体中实现, 但 α (1, 3)GT 基因敲除小鼠已成功^[25, 26]。这种小鼠不表达 Gal α (1, 3)Gal, 而且在具有 Gal α (1, 3)Gal 表位的肠道菌群或兔红细胞膜 (Rabbit red blood cell membranes) 的反复免疫后还能产生抗 gal 抗体。另外对细胞表面糖基化的影响也不显著^[26], 尽管由于无 α (1, 3)GT 酶活性而暴露出大量的 N-乙酰基乳糖胺残基末端, 但唾液酸化的程度并没因此而有增减。然而在回体 (ex vivo) 实验中, α (1, 3)GT 基因敲除小鼠心脏用正常人血清灌注时仍旧发生排斥反应, 只是比野生小鼠延缓发生^[25], 这一现象的原因不明。

2. 反义核酸

可以通过反义 cDNA, 反义寡核苷酸或反义核酶等几种方式来破坏 α (1, 3)GT 的 mRNA^[27], 从而抑制 Gal α (1, 3)Gal 的表达。其中在体外 (in vitro) 实验中, 外源性的反义寡核苷酸使猪内皮细胞上 Gal α (1, 3)Gal 的表达下降了 40%。

3. 酶学竞争

这是利用 α (1, 3)GT 与其他一些糖基转移酶具有相同的糖基接受底物 N-乙酰基乳糖胺从而相互竞争这一底物的原理而设计的。目前用来竞争抑制 Gal α (1, 3)Gal 表达的糖基转移酶主要有以下几种:

1) α (1, 2)岩藻糖基转移酶 [α (1, 2)fucosyltransferase, α (1, 2)FT] 这种酶在异种器官移植中被研究得最广泛^[26, 28, 29], 它催化合成人 ABO 血型系统中的前体分子 H 血型抗原。以显微注射的方法将 α (1, 2)FT 基因引入小鼠基因组中, 使 H 血型抗原在小鼠血管内皮细胞上高表达, 显著地降低了 Gal α (1, 3)Gal 的表达^[26, 30]。而且, 在高尔基体内 N-乙酰基乳糖胺被首先暴露给 α (1, 2)FT, 然后才接触到 α (1, 3)GT, 这更有利于前者对后者的底物竞争。

但是, 在小鼠体内^[26] α (1, 2)FT 会导致细胞表面糖基化模式的改变, 它不仅降低了 N-乙

酰基乳糖胺的 $\alpha(2,3)$ 唾液酸化,还暴露了在正常情况下隐含的抗原,唾液酸化的 Tn 和 Forssman 抗原。由于人血清中具有抗这两种抗原的抗体,这些新暴露出来的抗原也会成为异种移植排斥反应的诱因。在 $\alpha(1,2)$ FT cDNA 转染的 CHO(Chinese hamster ovary)细胞上,也发现 $\alpha(1,2)$ FT 的表达对整个细胞糖基化的影响^[31]。Sepp 等^[32]利用过表达 $\alpha(1,2)$ FT 的猪内皮细胞系研究了细胞表面 H 血型抗原, Gala(1,3)Gal 和其它岩藻糖基化的及唾液酸化的糖基抗原的表达。正常情况下 Gala(1,3)Gal, $\alpha(2,3)$ -和 $\alpha(2,6)$ -唾液酸化的表位强表达,而 2 型 H 血清抗原和 Lewis^x 表位表达很弱。 $\alpha(1,2)$ FT 的表达使 H 血型抗原增强了 5-8 倍, $\alpha(2,3)$ -和 $\alpha(2,6)$ -唾液酸表位下降了 40%-50%。Lewis^x 表位被降低到背景水平,但作为一个新生抗原 Lewis^y 的表达被强烈上调。

在血管内皮细胞上表达人 H 血型抗原的转基因猪已有成功^[33,34],人 H 血型抗原的表达显著降低了 Gala(1,3)Gal 的表达,人 XNAs 对猪血管内皮细胞的反应性和人血清介导的细胞裂解作用^[34],另外,对人单核细胞的黏附和激活也有影响^[35]。

2) $\alpha(2,3)$ 唾液酸基转移酶^[36] [$\alpha(2,3)$ sialyltransferase, $\alpha(2,3)$ ST] 它催化 N-乙酰基乳糖胺的唾液酸化形成 N-唾液酸乙酰基乳糖胺,这是唾液酸化的 Lewis^x 的结构前体分子。 $\alpha(2,3)$ ST 基因的过表达使猪内皮细胞对人天然抗体的抗原性下降了 77%,并且 Gala(1,3)Gal 表位数量的下降同时伴有 $\alpha(1,3)$ GT mRNA 及 $\alpha(1,3)$ GT 酶活性的下降。

3) N-乙酰葡萄糖胺基转移酶^[37,38] (N-acetylglucosaminyltransferase III, GnT III) 它催化产生二等份的 GlcNAc 残基,是天冬酰胺连接的寡糖链分支过程中的关键酶。被转染进猪内皮细胞系后降低了 Gala(1,3)Gal 的表达,人天然抗体和 BS-IB₄ 凝集素对内皮细胞的结合下降了 70%-80%,并对补体介导的细胞裂解有抑制作用。

4) $\alpha(1,3)$ 岩藻糖基转移酶 [$\alpha(1,3)$ fucosyltransferase, $\alpha(1,3)$ FT] 和 $\alpha(2,6)$ 唾液酸基转移酶 [$\alpha(2,6)$ sialyltransferase, $\alpha(2,6)$ ST] 另外,这是两种可被用来竞争抑制 Gala(1,3)Gal 表位表达的糖基转移酶,不过目前的研究还不多。

4. 单链抗体

利用细胞内表达的单链 Fv(ScFv) 抗体封闭或调节 $\alpha(1,3)$ GT 的酶活性^[39]。这种针对 $\alpha(1,3)$ GT 的抗体已从噬菌体展示库中筛选到,编码抗体的 cDNA 转染进猪 LLC-PK1 上皮细胞后抑制了 $\alpha(1,3)$ GT 的酶活性,并使 Gala(1,3)Gal 的表达下降了 30%-40%。

5. α -半乳糖苷酶(α -galactosidase)

应用 α -半乳糖苷酶裂解末端 α 链连接的半乳糖基也可以降低或清除细胞表面的 Gala(1,3)Gal 抗原表位,用它处理红细胞,淋巴细胞和内皮细胞后, Gala(1,3)Gal 的数量显著下降,而且与人血清的反应性也下降。在清除 Gala(1,3)Gal 方面,人的 α -半乳糖苷酶,大肠杆菌的 α -半乳糖苷酶和咖啡豆 α -半乳糖苷酶都同样有效。

6. 组合法

上述降低 Gala(1,3)Gal 表位的方法都有各自的局限性,因此常常将不同方法组合应用以取长补短。最近 Costa 等^[40]用转基因小鼠模型比较了几种组合对 Gala(1,3)Gal 表位表达及人抗体-补体系统裂解细胞作用的影响。结果表明同时表达人补体调控蛋白 CD59 和人 $\alpha(1,2)$ FT 的转基因小鼠在抵抗人血清的裂解作用方面的能力与 $\alpha(1,3)$ GT 基因敲除小鼠相同,但是同时表达人 CD59 和 $\alpha(1,2)$ FT 的 $\alpha(1,3)$ GT 基因敲除小鼠并没能进一步增强它对血清裂解作用的抵抗力。这提示生产同时表达人补体调控蛋白和 $\alpha(1,2)$ FT 的转基因猪是目前替代猪 $\alpha(1,3)$ GT 基因敲除的最直接策略。

结束语

以猪为供体的猪-人异种器官移植是解决

目前人体器官移植中供体器官严重缺乏的可能途径。尽管已被研究证实造成猪-人之间带血管器官移植排斥反应的主要原因是猪体内 Gala(1,3)Gal 抗原表位的存在,并且对此也探索了各种各样的克服方法,但要得到满意的供体猪的器官,还需对此进行多方面的更深入的研究。

摘 要

改造猪的器官移植给人类被认为是解决人类移植器官供不应求的可能方案,但由于猪和人在免疫学上的差异使移植到人体的猪的带血管器官很快被排斥掉,本文综述了近十年来对猪-人之间最重要的差异性抗原表位的研究进展。

参 考 文 献

- [1] Dalmaso AP et al., 1992, *Am J Pathol*, **140**(5): 1157-1166.
- [2] Cooper DKC et al., 1994, *Immunol Rew*, **141**: 31-58.
- [3] Larsen RD et al., 1989, *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**(21): 8227-8231.
- [4] Joziassse DH et al., 1992, *J Biol Chem*, **267**(8): 5534-5541.
- [5] Joziassse DH et al., 1989, *J Biol Chem*, **264**(24): 14290-14297.
- [6] Sandrin MS et al., 1994, *Xenotransplantation*, **1**: 81-84.
- [7] Strahan KM et al., 1995, *Immunogenetics*, **41**(2-3): 101-105.
- [8] Henion TR et al., 1994, *Glycobiology*, **4**(2): 193-201.
- [9] Katayama A et al., 1998, *Glycoconj J*, **15**(6): 583-589.
- [10] Shaper NL et al., 1992, *Genomics*, **12**(3): 613-615.
- [11] McKenzie IF., 1994, *Transplant Immunol*, **2**(2): 81-86.
- [12] Oriol R., 1994, *Transpl Int*, **7**(6): 405-413.
- [13] Alwayn IPJ. 1999, *Xenotransplantation*, **6**: 157-168.
- [14] Chen RH., 1999, *Xenotransplantation*, **6**(3): 169-172.
- [15] Oriol R., 1999, *Xenotransplantation*, **6**: 79-89.
- [16] Galili U., 1993, *Blood*, **82**(8): 2485-2493.
- [17] Galili U., 1997, *Transplantation*, **63**(5): 646-651.
- [18] Galili U., 1997, *Xenotransplantation*, **4**: 127-131.
- [19] Minanov OP., 1997, *Transplantation*, **63**(2): 182-186.
- [20] Bach FH., 1995, *Nature Med*, **1**(9): 869-873.
- [21] Palmetshofer A., 1998, *Transplantation*, **65**: 844-853.
- [22] Palmetshofer A., 1998, *Transplantation*, **65**: 971-978.
- [23] Inverardi L., 1997, *Transplantation*, **63**(9): 1318-1330.
- [24] Artrip JH., 1999, *J Biol Chem*, **274**(16): 10717-10722.
- [25] Tange MJ., 1997, *Xenotransplantation*, **4**: 20-24.
- [26] Shinkel TA., 1997, *Transplantation*, **64**(2): 197-204.
- [27] Hayashi S., 1997, *Transplant Proc*, **29**(1-2): 893.
- [28] Nagasaka T., 1998, *Transplant Proc*, **30**(7): 3837-3838.
- [29] Chen CG., 1998, *Transplantation*, **65**(6): 832-837.
- [30] Chen CG., 1996, *Xenotransplantation*, **3**: 69-76.
- [31] Prieto PA., 1997, *J Biol Chem*, **272**(4): 2089-2097.
- [32] Sepp A., 1997, *J Biol Chem*, **272**(37): 23104-23110.
- [33] Koike C., 1997, *Transplant Proc*, **29**(1-2): 894.
- [34] Costa C., 1999, *FASEB J*, **13**(13): 1762-1773.
- [35] Kwiatkowski P., 1999, *Transplantation*, **67**(2): 219-226.
- [36] Tanemura M., 1998, *J Biol Chem*, **273**(26): 16421-16425.
- [37] Tanemura M., 1997, *Transplant Proc*, **29**(1-2): 895-896.
- [38] Tanemura M., 1997, *Transplant Proc*, **29**(1-2): 891-892.
- [39] Vanhove B., 1998, *Transplantation*, **66**(11): 1477-1485.
- [40] Costa C., 1999, *Xenotransplantation*, **6**: 6-16.